Aus dem Pharmakologischen Institut der Universität Tübingen.
Direktor: Professor Dr. Haffner.

Stufenphotometrische Bestimmung von Haemoglobin und Plasmaeiweiß in kleinen Blutmengen.

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin, Chirurgie und Geburtshilfe
einer Hohen Medizinischen Fakultät
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Dr. Eugen Huber
Arzt aus Ulm a. D.

1940.

Buchdruckerei Karl Bölzle, Tübingen, Marktgasse 10

Dekan: Prof. Dr. Haffner.

Berichterstatter: Prof. Dr. Haffner.

Zum Druck genehmigt von der Medizinischen Fakultät
der Universität Tübingen.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Dem Andenken meiner Eltern

aus Dankbarkeit.

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41549608_0132

Der Anlaß zu den folgenden Untersuchungen waren Fragen der Flüssigkeitsverschiebung im Blute.

Wie eine Reihe von Arbeiten der letzten Jahre ergeben haben, sind nicht nur die verschiedenen Funktionen des Wasserwechsels, sondern auch die verschiedenen Vorgänge entzündlicher Art, ja sogar zunächst rein hämodynamische Wirkungen, vielleicht schon physiologische Veränderungen der Gefäßweite und der Gefäßdurchlässigkeit von merklichem bedeutungsvollem Einfluß auf den „Flüssigkeitszustand" des strömenden Blutes.

Es kommen dabei zwei Arten seiner Beeinflussung in Frage:

1. Verschiebungen im Verhältnis Blutkörperchen : Plasma.
2. Verschiebungen im Verhältnis Plasmakolloide : Blutwasser.

Nach der Literatur [1]) ist zur Feststellung solcher Veränderungen die Haemoglobin-Bestimmung und die Bestimmung des Plasmaeiweißes mittels der Kjeldahl-Methode verschiedentlich angewandt worden. Es lag nahe, zu untersuchen, ob es möglich ist, mittels eines einfachen und auch bei Reihenuntersuchungen rasch arbeitenden Verfahrens solche Bestimmungen schon in einem in der üblichen Weise zu gewinnenden kleinen Blutstropfen in befriedigender Weise auszuführen. Der vorliegenden Arbeit war die Aufgabe gestellt worden, mittels des Pulfrich'schen Stufenphotometers von Zeiß Untersuchungen in dieser Richtung anzustellen.

Diese Untersuchungen gliedern sich in 2 Versuchsgruppen:

I. Ausarbeitung der Meßmethoden für die verschiedenen Reaktionen zur Bestimmung von Haemoglobin und Eiweiß.

II. Praktische Durchführung der Haemoglobin- und Eiweißbestimmung an einem Blutstropfen.

---

[1]) Eppinger: Die seröse Entzündung. Verlag Springer, Wien. 1935.

I. Stufenphotometrische Bestimmungen von:

A. Haemoglobin.

1. Haematin-Bestimmung.

In der Literatur ist über Haemoglobinbestimmungen mittels Stufenphotometer von Silfverskiöld[2]) berichtet. In den Dissertationen von Hannemann und Dölker; Tübingen 1939 und 1940, wurde im hiesigen Institut ebenfalls über die stufenphotometrische Haemoglobinbestimmung auf dem Weg über das Säurehaematin berichtet. Unsere eigenen Versuche schließen sich an diese vorausgegangenen Arbeiten an. Die Herstellung des Säurehaematins geschah durch Zusatz einer kleinen Menge Salzsäure zu den entsprechenden Verdünnungen des Gesamtblutes in physiologischer Kochsalzlösung. Die Konzentration der Salzsäure wurde so gewählt, daß in der endgültigen Meßlösung eine $n/_{10}$ bis $\frac{n}{30}$ Säurekonzentration vorlag; in diesem Konzentrationsbereich war ein Unterschied in dem entstandenen Haematin nicht festzustellen. Die Messung geschah unmittelbar nach Herstellung der Lösungen; auch bei längerem Stehen über mehrere Stunden wurden dieselben Resultate wie bei sofort vorgenommener Ablesung erhalten. Wir verwendeten die Cuvette mit 1 cm Schichtdicke (etwa 5 ccm Fassungsvermögen) und als Filter S 53 (grüngelb) mit destilliertem Wasser als Vergleichslösung. Auch bei wiederholter Durchprüfung der anderen Filter erwies sich S 53 allein als brauchbar. Als nächstes käme unter Umständen S 43 (violett) in Frage. Als gut ablesbaren Meßbereich, fanden wir etwa E = 0,60—0,10. Es entsprach diesem Bereich eine Verdünnung von Rinderblut 1 : 100—600. Wir führten bei allen unseren Reaktionen zur Prüfung der Genauigkeit Meßreihen mit verschiedenen Blut- bzw. Eiweißkonzentrationen durch, wobei jedesmal so vorgegangen wurde, daß in einer ersten Reihe die Nachweisreaktion mit den verschiedenen Blutkonzentrationen vorgenommen, in einer zweiten Versuchsreihe dagegen dieselben Blutverdünnungen nachträglich aus einem bereits fertigen Reaktionsgemisch hergestellt wurden. Tabelle 1. enthält ein Beispiel einer solchen Messung; zur raschen Orientierung ist darin sowohl der aus dem Ansatz errechnete prozentuale Sollwert, wie der aus den Ablesungen erhaltene prozentuale Meßwert angegeben. Die in der jeweiligen Versuchsreihe angewandte höchste Konzentration an Blutfarbstoff bzw. Eiweiß wurde = 100% gesetzt. Die Meßwerte sind außerdem kurvenmäßig dargestellt, wobei die bei Durchführung der Reaktion in den einzelnen Verdünnungen gefun-

[2]) Silfverskiöld: Skandinav. Arch. f. Physiologie. Bd. 79. Suppl. Nr. 14. S. 30.

denen Werte mit einem Kreuz, die bei nachträglicher Verdünnung erhaltenen Werte dagegen mit einem Kreis auf dem Millimeterpapier eingetragen wurden. Im geeigneten Meßbereich sind die E-Werte dem Farbstoff- bezw. Trübungsgehalt genau proportional, liegen somit bei verschiedenen Konzentrationen auf einer Geraden.

Nach unseren Ergebnissen kann, wie auch aus Tabelle 1. zu ersehen ist, eine Genauigkeit auf 1—2% erreicht werden. Bei nachträglicher Verdünnung werden, wie ebenfalls aus der Tabelle zu entnehmen ist, dieselben Resultate erhalten wie bei der unmittelbaren Anstellung der Reaktion in der jeweiligen Verdünnung.

In Tabelle 2. folgt das Beispiel einer Haemoglobinbestimmung über Haematin im Kaninchenblut. Das Blut wurde dem Kaninchen aus der Ohrvene entnommen, durch Rühren mit einem Glasstabe defibriniert und davon mit der Mikropipette verschiedene Mengen auf je 10ccm $\frac{n}{30}$ HCl gegeben. Wie die Tabelle ergibt, wurden auch hiebei mit einer einzigen Ausnahme gut übereinstimmende Werte erhalten.

Die Haematinmethode eignet sich somit sehr gut zur stufenphotometrischen Bestimmung des Blutfarbstoffes in kleinen Blutmengen.

2. Bestimmung des reduzierten Haemoglobins.

Da von verschiedenen Autoren (Humperdink) die Haematinmethode als nicht immer zuverlässig bezeichnet wird, wurden auch Versuche mit Bestimmung über das reduzierte Haemoglobin vorgenommen. Die Reduktion geschah nach den Angaben von Bürker mittels Natriumhydrosulfit in alkalischer Lösung. Wegen der geringen Haltbarkeit des Reagens wird dieses zweckmäßigerweise in Substanz unmittelbar vor der Messung der alkalischen Blutlösung zugegeben. Für unsere Vorversuche stellten wir jedoch eine 10%ige Lösung in $\frac{n}{1}$ NaOH her; bei sofortiger Anwendung ergaben sich dabei keine Schwierigkeiten. Die Messung geschah unmittelbar nach Mischung des mit Kochsalz verdünnten Blutes mit dem Reagens in der Cuvette von 1 cm Schichtdicke. Wie sich beim Durchprobieren der verschiedenen Filter zeigte, war auch hiefür Filter S 53 (grüngelb) am geeignetsten.

Tabelle 3. enthält einen Versuch, bei welchem verschiedene Konzentrationen des Reagens zur Anwendung kamen; die Verdünnung des Blutes (defibriniertes Rinderblut) betrug durchweg 1 : 200, die des Hydro-

sulfits zwischen 0,025 und 2,5% in der Meßlösung. Wie aus der Ablesung hervorgeht, ergaben sich unabhängig von der Hydrosulfit-Konzentration innerhalb von etwa 2% übereinstimmende Werte. Tabelle 4. zeigt einen Versuch mit gleichbleibender (2,5%) Hydrosulfit-Konzentration und verschiedenen bis 1 : 4 400 steigenden Verdünnungen von Rinderblut. Bis zur Verdünnung 1 : 54 waren die Lösungen wegen zu starker Lichtabsorption nicht meßbar, von etwa 1 : 1 000 an werden die Ablesungen unsicher; dazwischen wurden wiederum sehr befriedigende Resultate erzielt.

Die Bestimmung des Blutfarbstoffes über das reduzierte Haemoglobin ist somit ebenfalls auch für die stufenphotometrische Bestimmung in kleinen Blutmengen ausgezeichnet geeignet und hat gegenüber der Haematinbestimmung lediglich den Nachteil geringer Haltbarkeit der Probe.

B. Plasma — Eiweiß.

a) Kolorimetrische Messung

Für die kolorimetrische Bestimmung des Eiweißgehaltes des Plasmas versuchten wir verschiedene Methoden anzuwenden. Die Millon'sche Probe ergibt auch noch in starken Serumverdünnungen einen gefärbten Niederschlag, der für die kolorimetrische Bestimmung ungeeignet ist. Die Diazo-Reaktion bewirkt in den für die Anwendung kleiner Blutmengen notwendigen Verdünnungen eine zu schwache Färbung der Lösung.

Die Ninhydrinreaktion wurde mit Verdünnungen von Rinderserum zwischen 1 : 100 und 1 : 1000 angestellt; zu 5 ccm wurden zwischen 0,1 und 0,5 ccm 1%iger wässeriger Ninhydrinlösung zugegeben und die Lösungen erhitzt. Selbst stundenlange Erhitzung im kochenden Wasserbad führte noch zu keiner Blaufärbung; 1 minutenlanges Kochen über der Flamme und anschließende halbstündige Behandlung im kochenden Wasserbad ergab brauchbare gleichmäßige Ergebnisse. Bei 300fach verdünntem Serum wurde bei einer Zugabe von 0.1 ccm Ninhydrinlösung noch ungenügende, ab 0,25 ccm dagegen maximale Blaufärbung erhalten. Zur Messung eignet sich Filter S 53 (grüngelb), ebenso Filter S 57 (braungelb) und als Serumverdünnung 1 : 300—1 : 600. (Vergleichslösung destilliertes Wasser). Die nachträgliche Verdünnung ergibt dieselben Werte wie die direkte Reaktion der betr. Verdünnung. Eine 300fache Verdünnung eines Rinderserums ergab bei 1 cm Schichtdicke unter Filter S 53

E = 0,33—0,34, unter Filter S 57 E = 0,30—0,31. Die Ninhydrin-Probe erscheint darnach an sich für die stufenphotometrische Messung geeignet zu sein.

Die Biuretreaktion ist schon wiederholt zu kolorimetrischen Bestimmungen verwendet worden[3]) [4]) und wird auch für die Stufenphotometrie geeignet bezeichnet[5]).

Unsere ersten Versuche waren darauf gerichtet, die für eine maximale Färbung notwendige Kupfersulfatmenge festzustellen. Dabei ergab sich, daß man, wie zu erwarten war, soviel Kupfersulfat zugeben muß, daß ein kleiner Ueberschuß ungelöst bleibt. Da man diesen Ueberschuß vor der Messung entfernen muß, was am besten mittels Auszentrifugierens geschieht, wurde der Versuch gemacht, nach Art der Fehling'schen Zuckerprobe die gesamte angewandte Kupfersulfatmenge zur Vermeidung des Zentrifugierens in Lösung zu erhalten. Voraussetzung für dieses Vorgehen war, daß es möglich ist, mittels des Stufenphotometers die Biuretfarbe neben der Kupfersulfatfarbe zu bestimmen. Dabei ergab sich, daß zwar bei Anstellung der Probe mit verschiedenen Serumkonzentrationen die Meßwerte eine deutliche Parallelität mit den Konzentrationsabstufungen zeigten, die Proportionalität war jedoch nicht so, daß sie für Meßzwecke ausgereicht hätte. Am geeignetsten erwies sich unter den verschiedenen Filtern noch Filter S 53. Doch war auch bei Benützung dieses Filters die Trennung der beiden Farben so unvollständig, daß z. B. eine 40fache Serumverdünnung mit 0,2 ccm Fehling auf 5,0 ccm Serumlösung einen E-Wert von 0,30, mit 0,4 ccm Fehling dagegen den Wert von 0,45 ergab, obwohl die Kupfersulfatmenge von 0,2 an sich für die maximale Biuretfärbung ausgereicht hätte; auch wenn die Messung statt mit destilliertem Wasser mit Fehling'scher Lösung als Vergleich ausgeführt wurde, änderte sich daran nichts Wesentliches. Der Weg war also nicht gangbar; es wurde daher nach dem üblichen Verfahren gearbeitet, die Serumlösung wurde mit Natronlauge versetzt und dazu Kupfersulfatlösung zugegeben. Die Proben blieben mindestens 2 Stunden stehen und wurden darauf zentrifugiert; das überschüssige Kupferhydroxyd gab einen fest haftenden Niederschlag, von dem die überstehende Lösung bis zum letzten Tropfen abgegossen werden konnte.

In Tabelle 5. ist ein Versuch wiedergegeben, in welchem der Einfluß der Natronlaugenkonzentration auf die Stärke der Färbung deutlich in Erscheinung tritt, in $\frac{n}{5}$ NaOH wird nur $^2/_3$—$^3/_4$ der maximalen

[3]) Autenrieth, Münch. Med. Woch. Schr. 1915. S. 1417. 1917. S. 241.
[4]) Hiller zit. nach Rona. Prakt. d. Physiol. Chemie II. Teil Springer. 1929. S. 601.
[5]) Löwe; Optische Messungen des Chemikers und des Mediziners. Verlag Steinkopff; 1939. S. 158.

Farbtiefe erreicht. Auf Grund weiterer Versuche dieser Art verwendeten wir als Medium $\frac{n}{1}$ NaOH, und stellten deshalb auch alle späteren und nachträglichen Verdünnungen mit Normallauge her. Bei ungenügender Alkaleszenz nahm die Farbtiefe auch mit der Kupfersulfatmenge zu (Nr. 1—3 der Tabelle 5).

Der notwendige Alkaleszenzgrad ist abhängig von der Serumkonzentration; bei den in unseren weiteren Versuchen verwendeten Serumverdünnungen von 1 : 60 oder mehr erwies sich auch $\frac{n}{10}$ NaOH als ausreichend (vgl. Tab. 6), weshalb diese Verdünnungen in der Regel mit $\frac{n}{10}$ NaOH angesetzt wurden.

Bei genügender Alkaleszenz war zwischen 0,2—0,4 bezw. 0,15—0,3 ccm Fehling I kein Unterschied im Ergebnis zu bemerken (Tabelle 7). Auch 0,1 ccm Fehling I reicht bei den im allgemeinen verwendeten Serumkonzentrationen für 5 ccm Lösung zur maximalen Färbung aus, bei niedereren Serumkonzentrationen u. U. auch noch weniger (vgl. Tab. 8); im allgemeinen verwendeten wir weiterhin 0,1 ccm Fehling I-Lösung (= 6,8% $CuSO_4$) auf 5 ccm Meßlösung.

Weitere Versuche dienten dazu die Genauigkeit der Messung eingehend zu prüfen; in der Regel wurde dabei auch stets das Verhalten einer nachträglichen Verdünnung mit untersucht.

Tab. 9. enthält ausgehend von einer 30fachen Serumverdünnung verschiedene Abstufungen von etwa 1 : 30—1 : 150; Tab. 10. ausgehend von Serumverdünnungen 1 : 40 und 1 : 60, engere Abstufungen von 1 : 40—1 : 50; und von 1 : 60—1 : 75, Tab. 11. von einer Serumverdünnung 1 : 80 ausgehend Abstufungen von 1 : 80— etwa 1 : 100. Die Tabellen 12. und 13. enthalten weitere längere Verdünnungsreihen.

Wie die Tabellen und die zugehörigen Kurven erkennen lassen, eignet sich die Biuretreaktion zweifellos sehr gut für die stufenphotometrische Eiweißbestimmung im Serum, auch bei relativ kleinen vorhandenen Versuchsmengen, da noch Verdünnungen des Serums bis etwa 1 : 100 brauchbare Ablesungsresultate ergeben.

Anhangsweise sei noch ein Versuch erwähnt, bei dem verschiedene Konservierungmmittel hinsichtlich der Haltbarkeit des Serums und der Beeinflussung der Biuretreaktion im Serum geprüft wurden.

Es kamen zur Verwendung:
defibriniertes Rinderserum + Phenol (0,5%ig), ferner Thymol, Kampfer und Aspirin in fester Substanz.

Es wurde je 0,6 ccm Serum + Konservierungsmittel 24 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH und 0,5 ccm Fehling I zur Anstellung der Biuretreaktion zugegeben. Die Proben wurden mehrere Stunden stehen gelassen; sie zeigen sämtlich schöne violette Biuretreaktion in der gleichen Farbtiefe. Messung der Proben mit Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vgl. Lösung: Aqu.dest.

Probe	E-Ablesung		
Serum + Phenol	0,23	0,23	0,23
Serum + Thymol	0,225	0,23	0,23
Serum + Kampfer	0,235	0,23	0,235
Serum + Aspirin	0,37	0,36	0,37

Mit Ausnahme von Aspirin entsprechen die anderen Proben dem zu erwartenden Wert; im übrigen ergab sich:

Thymol: nach 1 Tag verfärbten Ausfall,

Kampfer: nach mehreren Tagen unverändertes, klares Serum,

Aspirin: schon nach einigen Stunden verfärbten Ausfall,

Phenol: nach mehreren Tagen noch unverändertes Serum.

b) Nephelometrische Bestimmungen.

Immerhin erreicht die Biuretreaktion die Empfindlichkeit der Blutfarbstoffbestimmung noch nicht und verlangt eine Blutmenge von mindestens 0,05 ccm, die aber der Genauigkeit der Ablesung wegen zweckmäßigerweise 0,1 ccm betragen sollte. Aus diesem Grund wurde weiterhin versucht, mittels nephelometrischer Methoden noch kleinere Serummengen zu bestimmen.

Nach der Literatur sind nephelometrische Eiweißbestimmungen mittels Stufenphotometer für die Caseinfällung durch Chinidin und für Eiweißlösungen ausgearbeitet worden; über die nephelometrische Eiweißbestimmung im Blute haben wir keine Angaben gefunden. Im Folgenden wurden Versuche in dieser Richtung an der Fällung durch Chinidin. sulfuric., Hitze, Alkohol, Trichloressigsäure und Sulfosalicylsäure unternommen.

Sämtliche nephelometrischen Bestimmungen wurden mit ein und derselben Meßröhre durchgeführt: Reagenzrohr mit 14,55 mm Innendurchmesser; Beleuchtung keilförmig. Flüssigkeitsmenge nicht unter 5 ccm. Wie bei der kolorimetrischen Methode stellten wir einmal durch wiederholte Ablesung die Genauigkeit der Messung als solche fest; des weiteren wurde durch Anwendung verschiedener Serumverdünnungen die Richtigkeit der erhaltenen Konzentrationswerte geprüft. Bei dem nephelometrischen Verfahren verändern sich die abgelesenen (logarithmischen) E-Werte proportional dem Logarithmus der gemessenen Eiweißkonzentration, müssen daher in einem Koordinatensystem aus E-Werten und den Logarithmen der angewandten Eiweißkonzentrationen auf einer Geraden liegen.

Ein weiterer Versuch mittels Silbernitrat, das Eiweiß und das Chlor nebeneinander zu bestimmen, führte bisher noch zu keinen verwertbaren Ergebnissen.

Auch die Chinidinfällung ergab Schwierigkeiten. 5 ccm einer 100fachen Serumverdünnung wurden mit gleichen Mengen verschieden konzentrierter Chinidinlösung vermischt und 15 Min. ins kochende Wasserbad gebracht. Es trat dabei eine an sich für die Messung geeignete sehr stabile Trübung auf; bei einer Serumverdünnung 1 : 200 dürfte die Grenze einer für die Nephelometrie an sich noch in Betracht kommenden Trübung gelegen sein. Andererseits ist der Trübungsgrad stark von der Chinidinkonzentration abhängig; für die Serumverdünnung 1 : 100 liegt die notwendige Chinidinkonzentration bei der halben Verdünnung einer heißgesättigten Lösung. Die getrübten Lösungen zeigen ein bemerkenswertes Verhalten bezügl. der Fluoreszenz; bei Serumüberschuß fehlt die Fluoreszenz vollkommen; je mehr das Verhältnis Chinidin : Eiweiß zu Gunsten des ersteren zunimmt, desto deutlichere Fluoreszenz tritt auf. Diese Fluoreszenzerscheinung hat sich uns bei der Nephelometrie so störend bemerkbar gemacht, daß von einer weiteren Verfolgung dieses Weges abgesehen wurde (die Fluoreszenz erhöht die Ablesungswerte und täuscht dadurch eine höhere Eiweißkonzentration vor). Bei früheren im Institut an Casein durchgeführten Untersuchungen wurden diese Schwierigkeiten nicht gefunden.

Zur Feststellung der Brauchbarkeit einer Alkoholfällung wurden verschiedene Verdünnungen von Rinderserum mit Wasser mit verschiedenen Alkoholkonzentrationen gemischt. Bei Zugabe einer 9fachen Menge absoluten Alkohols tritt bis herunter zu einer etwa 100fachen Serumverdünnung (also einer etwa 1000fachen Serumverdünnung) in der alkoholhaltigen Reaktionslösung nach kurzer Zeit eine sichtbare rasch ausflokkende Trübung auf; auch die zunächst für das Auge noch nicht getrübte Endverdünnung von etwa 1 : 2000—3000 ergab nach Zentrifugieren

noch einen merklichen Bodensatz, während die doppelte Verdünnung keine Fällung mehr erkennen ließ. Bei Anwendung schwächerer Alkoholkonzentrationen tritt die Ausflockung immer weniger auf; für eine nephelometrische Messung dürfte sich eine etwa 50%ige Endkonzentration des Alkohols gut eignen; eine meßbare Opaleszenz ist hiebei noch bei einer Endverdünnung des Serums 1 : 3000 vorhanden. Bei 25% Alkohol geht eine mit dem Auge noch sichtbare Trübung bis zu etwa derselben Serumverdünnung, doch ist die Trübung in keiner Serumverdünnung mehr sicher meßbar, sie opalesziert nicht mehr. Am besten arbeitet man mit einer Endverdünnung des Serums von 1 : 500—1 : 2000, die Trübung ist über viele Stunden stabil.

Die „Kochprobe" ergibt im Reaktionsoptimum der Serumeiweißfällung (4,5—5,0 ph) ebenfalls eine gut brauchbare Trübung. Die zu messende Serumverdünnung wurde zur Einstellung der Reaktion zu gleichen Teilen mit dem sog. Standardacetat-Gemisch (Essigsäure : Natriumacetat $= \frac{1}{1}$ mit einem Gehalt von $\frac{n}{30}$ Natriumacetat) gemischt und die Lösungen für 15 Min. ins kochende Wasserbad gebracht. Die entstehenden Trübungen sind ausreichend stabil, um die Messung nach Abkühlung der Lösungen vornehmen zu können. Zur Messung diente Grünfilter L_2 und bei Serumendverdünnungen von 1 : 200—1 : 600 Scheibe 4., bei Serumendverdünnungen darunter Scheibe 2. Die Werte sind zwischen Serumendverdünnungen von 1 : 200—1000 und wohl auch etwas darunter gut meßbar; wie die in den Tabellen 14. und 15. wiedergegebenen Versuchsbeispiele erkennen lassen, auch ausreichend reproduzierbar, um die Probe als für die Nephelometrie geeignet ansprechen zu dürfen. Im Gegensatz zu den kolorimetrischen Proben ergibt die nachträgliche Verdünnung fehlerhafte (zu hohe) Werte.

Die Fällung mit Sulfosalicylsäure, die durchweg so vorgenommen wurde, daß der zu messenden Serumverdünnung gleiche Teile 20%iger Sulfosalicylsäure in Wasser zugesetzt wurde, ergab bei genügender Serumverdünnung eine ausreichend stabile Trübung, die auch nach Absetzen und Wiederaufschütteln ihren Meßwert beibehielt. Auch hier führte jedoch eine nachträgliche Verdünnung der Fällung zu anderen Resultaten als die Fällung in der gleichen im Voraus hergestellten Serumverdünnung. Die Messung geschieht zweckmäßigerweise in Serumendverdünnungen zwischen 1 : 500 und 1 : 2000 mittels Grünfilter L_2 und Scheibe 4. Wie die Versuchsbeispiele (Tab. 16, 17 und 18) erkennen lassen, ist die Schärfe der einzelnen Ablesung auf 1—3% genau, auch diese Methode deshalb ohne Zweifel für den gedachten Zweck brauchbar.

Zu ähnlichen Resultaten führte die Untersuchung der Trichloressigsäure. Die Durchführung der Probe geschah ganz entsprechend wie bei der Sulfosalicylsäure. Die Empfindlichkeit der Methode geht noch etwas weiter und man muß auch dementsprechend in genügend starken Serumverdünnungen arbeiten, um ein zu rasches Ausflocken der Fällung zu vermeiden. Die geeignete Endverdünnung des Serums liegt von 1 : 2000 bis 1 : 8000. Dabei ist die Genauigkeit der einzelnen Ablesung ohne Schwierigkeit auf 1—2% zu gestalten. Wiederaufschütteln einer Ausflockung ändert am ursprünglichen Ergebnis nichts, dagegen führt die nachträgliche Verdünnung der Fällung auch hier zu anderen Resultaten als die unmittelbare Fällung der entsprechenden Verdünnung. Beispiele mit Trichloressigsäure sind in Tab. 19, 20 und 21 aufgeführt. Es gelingt somit, durch nephelometrische Auswertung verschiedener Fällungsreaktionen den Gehalt an (fällbarem) Eiweiß im Serum noch bei wesentlich stärkeren Serumverdünnungen mit ausreichender Genauigkeit (im günstigen Falle 1—2%) zu bestimmen.

II. Stufenphotometrische Analyse eines Bluttropfens auf Haemoglobin und Plasmaeiweiß mit Blutentnahme am lebenden Tier.

In den Versuchen des vorausgegangenen Abschnittes standen größere Mengen von defibriniertem Blut zur Verfügung; in der Regel stammen die einzelnen Versuche von verschiedenen Tieren und sind daher in ihren absoluten Ergebnissen nicht miteinander vergleichbar. Es möge hier erwähnt werden, daß bei derselben Probe defibrinierten Rinderblutes vom Schlachthof folgende Blutfarbstoff- und Eiweißwerte gefunden wurden:

Haematinwert Filter S 53 (grüngelb) Cuvette 1 cm Schichtdicke Vgl. Lösg. Aqu. dest.	E-Ablesung	Sulfosalicylsäurewert Grünfilter L_2 und Scheibe 4 E-Ablesung
220fache Blutverdünnung in NaCl	0,445	
400fache Blutverdünnung (in Meßlösg.)		1,12
auf 200fache Blutverdg. berechnet	0,5	2,24

Zur endgültigen Prüfung auf Brauchbarkeit unseres Verfahrens für die praktische Anwendung am lebenden Objekt wurden einige Versuche angeschlossen, bei denen die Analyse an einem in üblicher Weise mit einer Pipette aufgenommenen Blutstropfen vorgenommen wurde. Zur Blutentnahme wurden Kaninchen und Meerschweinchen verwendet. Die Entnahme geschah in beiden Fällen am Ohr, beim Kaninchen durch Anritzen einer kleinen Vene, beim Meerschweinchen mittels eines etwa 1 cm langen Scherenschlages durch den Ohrrand. Die Aufnahme und Abmessung des Blutes geschah mit einer Mikropipette, die in 0,002 ccm unterteilt war. Abweichend von der sonst üblichen Abmessung einer schon im Voraus festgelegten Blutmenge z. B. von 0,01 ccm hielten wir es für genauer und einfacher, das Blut bis zu einer sich rasch einstellenden beliebigen Höhe aufzuziehen und erst hinterher an den Teilstrichen die erhaltene Menge abzulesen. Nach der Säuberung der Pipettenspitze wurde der Pipetteninhalt unverzüglich in eine vorgelegte Lösung von 0,9%-iger Kochsalzlösung mit einem Gehalt von 0,4% Natriumcitrat ausgeblasen und durch 5maliges Aufziehen der Pipette die Genauigkeit der Verdünnung gewährleistet. Auf Grund der durch die Ablesung erhaltenen Blutmenge wurde nunmehr die Vorlage mit Kochsalz-Citratlösung auf die für die zur Weiterverarbeitung notwendige Blutverdünnung gebracht. Die angewandten Verdünnungen sind aus den Versuchen zu entnehmen. Von der Blutverdünnung wurde nun zunächst die notwendige Menge für die Blutfarbstoffbestimmung entnommen; der Rest zentrifugiert und das klare Zentrifugat für die Eiweißbestimmung verwendet. Tab. 22—25 enthalten 2 Meßbeispiele an Kaninchen und 2 an Meerschweinchen.

Wie die Tabellen erkennen lassen, erhält man bei unserem Vorgehen auch am lebenden Objekt gut übereinstimmende Werte. Wir glauben daher, daß man für die in der Einleitung erwähnten Zwecke das Verfahren der stufenphotometrischen Haemoglobin- und Plasmaeiweiß-Bestimmung im gleichen Blutstropfen empfehlen kann.

Die Untersuchungen wurden im 1. Trimester 1940 im Pharmakologischen Institut auf Anregung von Professor Dr. Haffner unter Leitung von Dozent Dr. W. Schmid ausgeführt.

Dr. E. Huber.

Tabelle Nr. 1.

Haematin-Bestimmung an defibriniertem Rinderblut vom Schlachthof.

Ausgangslösung: 0,5 ccm defibriniertes Rinderblut — 100 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung.

Reaktion: Blutverdünnung $+\frac{n}{3}$ HCl.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke: Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung ccm	+ 0,9 %ige NaCl-Lsg. ccm	+ $\frac{n}{3}$ HCl ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	10	0	1	100	0,45	0,445	0,44	100
2.	9	1	1	90	0,40	0,41	0,40	89,9
3.	8	2	1	80	0,37	0,37	0,365	83,1
4.	7	3	1	70	0,33	0,34	0,34	74,1
5.	6	4	1	60	0,28	0,285	0,28	62,9
6.	5	5	1	50	0,23	0,23	0,23	51,6
7.	4	6	1	40	0,18	0,185	0,185	40,4
8.	3	7	1	30	0,135	0,13	0,13	29,2
9.	2	8	1	20	0,10*)	0,10*)	0,10*)	22,4
	Nachträgliche Verdünnung:							
10.	5 ccm von 1.	5	—	50	0,23	0,25	0,235	50,3
11.	5 „ „ 3.	5	—	40	0,19	0,19	0,185	40,4
12.	2,5 „ „ 2.	5	—	30	0,10*)	0,10*)	0,11*)	22,5
13.	3,0 „ „ 1. + 3,0 „ „ 2.	—	—	95	0,43	0,42	0,44	95,2
14.	3,0 „ „ 3. + 3,0 „ „ 4.	—	—	75	0,34	0,34	0,36	76,4
15.	3,0 „ „ 5. + 3,0 „ „ 6.	—	—	55	0,255	0,25	0,255	57,3

*) bedeutet: Wert schwer meßbar.

Tabelle Nr. 2.

Haematin-Bestimmung am Kaninchenblut.

Reaktion: Defibriniertes Blut aus einer Ohrvene des Kaninchens, mit der Mikropipette in verschiedenen Mengen abgemessen, wurde in $\frac{n}{30}$ HCl gebracht.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen			Meßergebnisse		
Nr.	Defibriniert. Blut ccm	+ $\frac{n}{30}$ HCl ccm	Verhältnis-zahlen	E-Ablesung		Verh.-zahlen
1.	0,005	10	1	0,07*)	0,065*) 0,06*)	1
2.	0,01	10	2	0,12	0,13	0,13	2
3.	0,015	10	3	0,21	0,195	0,20	3,1
4.	0,02	10	4	0,265	0,26	0,26	4
5.	0,025	10	5	0,30	0,31	0,30	4,6

Tabelle Nr. 3.

Bestimmung des reduzierten Haemoglobin an defibriniertem Rinderblut.

Ausgangslösung: 0,5 ccm defibriniertes Rinderblut + 50 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung

Reaktion: Reduktion des Hb durch 10%iges Natr. hydrosulfit in $\frac{n}{1}$ NaOH

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen			Meßergebnisse		
Nr.	Ausgangs-lösg. ccm	+ Reagens ccm	+ $\frac{n}{1}$ NaOH ccm	E-Ablesung		
1.	5	0,5	4,5	0,56	0,56	0,55
2.	5	1,0	4,0	0,55	0,55	0,56
3.	5	2,0	3,0	0,55	0,55	0,56
4.	5	5,0	0	0,545	0,55	0,55

Tabelle Nr. 4.

Bestimmung des reduzierten Haemoglobin an defibriniertem Rinderblut.

Ausgangslösung: 5.0 ccm defibriniertes Rinderblut und Verdünnung desselben mit Faktor 3 in 10 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung.

Reaktion: Reduktion des Hb durch 10%iges Natr. hydrosulfit in $\frac{n}{1}$ NaOH.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse		
Nr.	Ausgangs-lösung ccm	(Verdünnung)	+ Reagens ccm	= Ver-dünnung	E-Ablesung		
1.	5	(1 : 1)	5	1:2	nicht meßbar		
2.	5	(1 : 3)	5	1:6	„	„	
3.	5	(1 : 9)	5	1:18	„	„	
4.	5	(1 : 27)	5	1:54	„	„	
5.	5	(1 : 81)	5	1:160	0,73*)	0,73*)	0,73*)
6.	5	(1 : 240)	5	1:480	0,24	0,24	0,25
7.	5	(1 : 720)	5	1:1400	0,08	0,08	0,08
8.	5	(1 : 2200)	5	1:4400	ergibt keinen meßbaren Wert		

Tabelle Nr. 5.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: A. 0,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 20 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung + 5 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH.

Ausgangslösung: B. 0,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 25 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH.

Reaktion: Serumverdünnung + Fehling I.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen		Meßergebnisse		
Nr.	Ausgangslösung A. ccm	+ Fehling I ccm	E-Ablesung		
1.	5	0,1	0,37	0,38	0,37
2.	5	0,2	0,39	0,39	0,39
3.	5	0,4	0,42	0,42	0,43

Nr.	Ausgangslösung B. ccm	+ Fehling I ccm	E-Ablesung		
4.	5	0,1	0,51	0,51	0,51
5.	5	0,2	0,52	0,52	0,52
6.	5	0,4	0,52	0,52	0,52

Tabelle Nr. 6.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: **A.** 0.5 ccm defibriniertes Rinderserum + 50 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH

Ausgangslösung: **B.** 0.5 ccm defibriniertes Rinderserum + 50 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH

Reaktion: Serumverdünnung + 0,1 ccm Fehling I.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung A. ccm	+ H_2O ccm	+ Fehling I ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	5	0	0,1	100	0,19	0,19	0,20	100
2.	5	0,5	0,1	91	0,175	0,18	0,18	92,2
3.	5	1,0	0,1	83	0,165	0,165	0,16	84,4
4.	5	1,5	0,1	77	0,13	0,135	0,135	68,9
5.	5	2,0	0,1	71	0,11*)	0,115*)	0,115*)	58,5
6.	5	2,5	0,1	66	0,09*)	0,10*)		49,2

Nr.	Ausgangslösung B. ccm	+ H_2O ccm	+ Fehling I ccm	= %	E-Ablesung			= %
7.	5	0	0,1	100	0,19	0,19	0,19	100
8.	5	0,5	0,1	91	0,18	0,18	0,18	94,7
9.	5	1,0	0,1	83	0,16	0,165	0,165	85,8
10.	5	1,5	0,1	77	0,14	0,14	0,14	73,7
11.	5	2,0	0,1	71	0,12*)	0,12*)	0,12*)	63,1
12.	5	2,5	0,1	66	0,10*)	0,09*)		50,0

Tabelle Nr. 7.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: 1 ccm defibriniertes Rinderserum + 49 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung

Reaktion: Serumverdünnung + Fehling I.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke: Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse		
Nr.	Ausgangslösung ccm	0,9%ige + NaCl-Lösg. ccm	ca. 4 n + NaOH ccm	+ Fehling I ccm	E-Ablesung		
1.	3	3	1	0,2	0,17	0,17	0,17
2.	3	3	1	0,3	0,175	0,18	0,175
3.	3	3	1	0,4	0,18	0,185	0,185
4.	4,5	—	0,75	0,15	0,42	0,42	0,41
5.	4,5	—	0,75	0,225	0,42	0,42	0,42
6.	4.5	—	0,75	0,3	0,425	0,43	0,43

Tabelle Nr. 8.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: 0,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 30 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH

Reaktion: Serumverdünnung + 0,1 ccm Fehling I.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke: Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung ccm	+ $\frac{n}{1}$ NaOH ccm	+ Fehling I ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	5	0	0,1	100	0,37	0,37	0,38	100
2.	4	1	0,1	80	0,285	0,29	0,285	77,3
3.	3	2	0,1	60	0,24	0,24	0,24	64,8
4.	2	3	0,1	40	0,165	0,165	0,17	44,9
5.	1	4	0,1	20	0,11	0,12	0,12	31,3
6.	5	0	0,4	100	0,38	0,38	0,38	102,7
7.	5	0	0,1	100	0,22	0,22	0,22	59,4
			4 × verd.					
8.	1	4	0,4	20	0,12	0,12	0,11	31,3
9.	1	4	0,1	20	0,12	0,12	0,12	32,4
			4 × verd.					

Tabelle Nr. 9.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: **A.** 1,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 45,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH

Ausgangslösung: **B.** 1,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 45,0 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH + 0,9 ccm Fehling I.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung A. ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	+ Fehling I ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	4,5	0,5	0,1	112,5	0,6-*)			112,1
2.	4,0	1,0	0,1	100	0,53*)	0,535*)	0,54*)	100
3.	3,3	1,7	0,1	82,5	0,48	0,47	0,485	89,3
4.	2,5	2,5	0,1	62,5	0,39	0,39	0,39	72,9
5.	2	3	0,1	50	0,26	0,265	0,26	48,8
6.	1,5	3,5	0,1	37,5	0,20	0,21	0,205	38,3
7.	1	4	0,1	25	0,14	0,13	0,13	24,8

Nachträgliche Verdünnung: (nach 2 Stunden Stehen und Absetzen lassen).

Nr.	Ausgangslösung B. ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm		= %	E-Ablesung			= %
1.	4,5	0,5	—	112,5	0,6-*)			112,1
2.	4,0	1,0	—	100	0,535*)	0,53*)	0,54*)	100
3.	3,3	1,7	—	82,5	0,47	0,47	0,475	88
4.	2,5	2,5	—	62,5	0,375	0,375	0,375	70,1
5.	2,0	3,0	—	50	0,265	0,26	0,26	48,8
6.	1,5	3,5	—	37,5	0,195	0,195	0,20	38,5
7.	1	4	—	25	0,12	0,13	0,13	23,5

Tabelle Nr. 10.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: A_1. 1,0 ccm defibriniertes Rinderserum + 60 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH

Ausgangslösung: A_2. 1,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 60 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH.

Reaktion: Serumverdünnung + 0,2 ccm Fehling I

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung A_1 ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	+ Fehling I ccm	=%	E-Ablesung			=%
1.	10	0	0,2	100	0,30	0,30	0,295	100
2.	9,5	0,5	0,2	95	0,29	0,29	0,29	97,3
3.	9,0	1,0	0,2	90	0,27	0,275	0,28	92,3
4.	8,5	1,5	0,2	85	0,25	0,26	0,255	85,6
5.	8,0	2,0	0,2	80	0,235	0,24	0,24	79,9

Nr.	Ansgangslösung A_2 ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	+ Fehling I ccm	=%	E-Ablesung			=%
1.	10	0	0,2	100	0,45	0,46	0,455	100
2.	9,5	0,5	0,2	95	0,42	0,43	0,42	92,3
3.	9,0	1,0	0,2	90	0,40	0,41	0,40	87,9
4.	8,5	1,5	0,2	85	0,38	0,39	0,385	84,6
5.	8,0	2,0	0,2	80	0,36	0,365	0,365	79,8

Tabelle Nr. 11.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: **A.** 0,6 ccm defibriniertes Rinderserum + 48 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH

Ausgangslösung: **B.** 0,6 ccm defibriniertes Rinderserum + 48 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH + 1,0 Fehling I.

Reaktion: Serumverdünnung + Fehling I.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung A. ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	+ Fehling I ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	10	0	0,2	100	0,225	0,22	0.22	100
2.	9,5	0,5	0,2	95	0,205	0,21	0,21	94,1
3.	9,0	1,0	0,2	90	0,195	0,20	0,20	89,6
4.	8,5	1,5	0,2	85	0,17	0,17	0,16	75,1
5.	8,0	2,0	0,2	80	0,14	0,135	0,15	63,8

Nr.	Ausgangslösung B. ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	+ Fehling I ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	10	0	—	100	0,22	0,22	0,22	100
2.	9,5	0,5	—	95	0,20	0,20	0,20	90,9
3.	9,0	1,0	—	90	0,19	0,195	0,19	86,8
4.	8,5	1,5	—	85	0,16	0,16	0,17	74,1
5.	8,0	2,0	—	80	0,135	0,14	0,135	61,8

Tabelle Nr. 12.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: B_3. 1,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 90 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH + 1,8 ccm Fehling I.
(= 25% von B_1. der Tabelle 13).

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke;
Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen			Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	10	0	100	0,145	0,14	0,14	100
2.	9,5	0,5	95	0,13	0,13	0,13	92,2
3.	9	1	90	0,12	0,125	0,125	87,2
4.	8,5	1,5	85	0,11	0,11	0,11	78,0
5.	8	2	80	0,11	0,105	0,105	75,1
6.	7,5	2,5	75	0,10	0,10	0,10	70,9
7.	7	3	70	0,085	0,09	0,09	63,8
8.	6,5	3,5	65	nicht mehr meßbar			—
9.	6	4	60	„	„	„	—
10.	5,5	4,5	55	„	„	„	—
11.	5	5	50	„	„	„	—

Tabelle Nr. 13.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Biuretprobe.

Ausgangslösung: B_1. 6 ccm defibriniertes Rinderserum + 90 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH + 1,8 ccm Fehling I.

Ausgangslösung: B_2. 2,5 ccm defibriniertes Rinderserum + 90 ccm $\frac{n}{10}$ NaOH + 1,8 ccm Fehling I.

Messung: Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke: Vergleichslösung: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen			Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung B_1 ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	10	0	100	0,535*)	0,54*)	0,54*)	100
2.	9,5	0,5	95	0,51	0,51	0,51	94,8
3.	9,0	1,0	90	0,48	0,47	0,48	89,2
4.	8,5	1,5	85	0,45	0,45	0,44	83,6
5.	8,0	2,0	80	0,42	0,42	0,42	78,1
6.	7,5	2,5	75	0,40	0,40	0,40	74,3
7.	7,0	3,0	70	0,365	0,37	0,37	66,9
8.	6,5	3,5	65	0,345	0,345	0,35	64,3
9.	6,0	4,0	60	0,33	0,33	0,33	61,8
10.	5,5	4,5	55	0,30	0,30	0,31	55,7
11.	5,0	5,0	50	0,27	0,27	0,27	50,2

Nr.	Ausgangslösung B_2 ccm	+ $\frac{n}{10}$ NaOH ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	10	0	100	0,23	0,24	0,23	100
2.	9,5	0,5	95	0,22	0,22	0,22	94,4
3.	9,0	1,0	90	0,20	0,20	0,205	86,2
4.	8,5	1,5	85	0,19	0,185	0,19	80,6
5.	8,0	2,0	80	0,175	0,175	0,175	75,1
6.	7,5	2,5	75	0,16	0,16	0,16	68,7
7.	7,0	3,0	70	0,15	0,15	0,15	64,4
8.	6,5	3,5	65	0,14	0,14	0,14	60,1
9.	6,0	4,0	60	0,13	0,13	0,13	55,7
10.	5,5	4,5	55	0,115	0,115	0,115	49,3
11.	5,0	5,0	50	0,115*)	0,11*)	—	47,6

Tabelle Nr. 14.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels des Natriumacetat-Essigsäuregemisches $\frac{1}{1}$.

Ausgangslösung: Verdünnung von defibriniertem Rinderserum mit H_2O 1 : 100.

Reaktion: Serumverdünnung + Natriumacetat-Essigsäuregemisch $\frac{1}{1}$ zu gleichen Teilen.
Erhitzen 15 Min. im kochenden Wasserbad.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 4.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ansgangs-lösung ccm	+ H_2O ccm	+ Reagens ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	3	—	3	100	0,67	0,68	0,67	100
2.	2	1	3	66	0,47	0,47	0,47	62,9
3.	1	2	3	33	0,23	0,23	0,225	36,2

Bei der Berechnung der gemessenen Prozente wurde die jeweils unterstrichene Zahl zu Grunde gelegt.

Tabelle Nr. 15.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels des Natriumacetat-Essigsäuregemisches $\frac{1}{1}$.

Ausgangslösung: Verdünnung von defibriniertem Rinderserum mit H_2O 1 : 250.

Reaktion: Serumverdünnung + Natriumacetat-Essigsäuregemisch $\frac{1}{1}$ zu gleichen Teilen. Erhitzen 15 Min. im kochenden Wasserbad.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 2.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangs-lösung ccm	+ H_2O ccm	+ Reagens ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	5	—	5	100	0,365	0,37	0,38	100
2.	2	1	3	66	0,275	0,265	0,265	78,7
3.	1,5	1,5	3	50	0,17	0,18	0,18	64,5
	Nachträgliche Verdünnung:							
4.	4 von 1.	1	1	66	0,34	0,33	0,33	39,8
5.	3 „ 1.	1,5	1,5	50	0,265	0,275	0,27	79,4

Tabelle Nr. 16.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Sulfosalicylsäure.

Ausgangslösung: Verdünnung von defibriniertem Rinderserum mit H_2O 1 : 200.

Reaktion: Serumverdünnung + 20%ige Sulfosalicylsäure zu gleichen Teilen.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 4.

Nr.	Gemessene Lösungen: Ausgangslösung ccm	+ Verdünnungsmittel ccm	+ Reagens ccm	= %	Meßergebnisse: E-Ablesung			= %
1.	6	0	6	100	1,13*)	1,14*)	1,14*)	100
2.	4	2	6	66	0,97	0,96	0,96	65,9
3.	3	3	6	50	0,88	0,89	0,89	56,2
	Nachträgliche Verdünnung:							
4.	4 von 1.	2	—	66	0,95	0,97	0,98	67,6
5.	4 „ 1.	4	—	50	0,87	0,88	0,87	53,8

Tabelle Nr. 17.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Sulfosalicylsäure.

Ausgangslösung: Verdünnung von defibriniertem Rinderserum mit H_2O 1 : 1000.

Reaktion: Serumverdünnung + 20%ige Sulfosalicylsäure zu gleichen Teilen.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 4.

Nr.	Gemessene Lösungen: Ausgangslösung ccm	+ H_2O ccm	+ Reagens ccm	= %	Meßergebnisse: E-Ablesung			= %
1.	6	0	6	100	0,45	0,46	0,45	100
2.	4	2	6	66	0,37	0,36	0,37	83,3
3.	3	3	6	50	0,21	0,22	0,215	58,1
	Nachträgliche Verdünnung:							
4.	4 von 1.	2	—	66	0,355	0,365	0,36	81,3
5.	4 von 1.	4	—	50	0,23	0,22	0,23	60,2

Tabelle Nr. 18.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Sulfosalicylsäure.

Ausgangslösung: 0,5 ccm defibriniertes Rinderblut + 100 ccm 0,9%ige NaCl-Lösung.

Reaktion: Versetzen des Zentrifugats der Blutverdünnung mit 20%iger Sulfosalicylsäure.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 4.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung ccm	+ H_2O ccm	+ Reagens ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	6	0	6	100	1,12	1,13	1,11	100
2.	3	3	6	50	0,83	0,83	0,84	51,3
3.	1,5	4,5	6	25	0,54	0,53	0,53	25,7
4.	0,75	5,25	6	12,5	0,24	0,23	0,225	12,9

Tabelle Nr. 19.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Trichloressigsäure.

Ausgangslösung: Verdünnung von defibriniertem Rinderserum mit 0,9%iger NaCl-Lösung.

Reaktion: Serumverdünnung + 20%ige Trichloressigsäure zu gleichen Teilen.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 4.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Serumverdünnung in 0,9%iger	NaCl-Lösung ccm	+ Reagens ccm	= %	E-Ablesung			= %
1.	1:100	3	3	100	1,15*)	1,17*)	1,15*)	100
2.	1:200	3	3	50	1,02	1,01	1,02	74,1
3.	1:400	3	3	25	0,79	0,80	0,79	43,7

Tabelle Nr. 20.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Trichloressigsäure.

Ausgangslösung: Verschiedene Verdünnungen von defibriniertem Rinderserum mit H_2O.

Reaktion: Serumverdünnung + 20%ige Trichloressigsäure zu gleichen Teilen.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 4. bezw. Scheibe 2.

Nr.	Gemessene Lösungen: Ausgangslösung ccm	Verdünnung	Reagens ccm	Endverdünnung	=%	Meßergebnisse: Scheibe 4. E-Ablesung			=%
1.	3	1:500	3	1:1000	100	0,64*)	0,63*)	0,645*)	100
2.	3	1:1000	3	1:2000	50	0,31	0,31	0,31	46,7
3.	3	1:2000	3	1:4000	25	0,155	0,16	0,155	32,6
4.	3	1:4000	3	1:8000	12,5	ergibt kein. meßb. Wert			—
	weitere Verdünnung mit H_2O:					Scheibe 1.	Sch. 2.	Sch. 3.	Sch. 4.
5.	3 von 4.	+ 3		1:16000	6,25	0,46*)	0,165	*)	*)	—
6.	3 „ 5.	+ 3		1:32000	3,125	ergibt kein. meßb. Wert				—

Nr.	Ausgangslösung ccm	Verdünnung	Reagens ccm	Endverdünnung	=%	Scheibe 2. E-Ablesung			=%
1.	3	1:1000	3	1:2000	100	0,87	0,86	0,86	100
2.	3	1:2000	3	1:4000	50	0,66	0,665	0,66	63,3
3.	3	1:4000	3	1:8000	25	0,50	0,51	0,50	43,7
4.	3	1:8000	3	1:16000	12,5	0,35	0,36	0,36	31,6
5.	3	1:16000	3	1:32000	6,25	0,20	0,215	0,22	22,4

Tabelle Nr. 21.

Bestimmung von Serumeiweiß mittels Trichloressigsäure.

Ausgangslösung: Verdünnung von defibriniertem Rinderserum mit 0,9%iger NaCl-Lösung 1 : 1000.

Reaktion: Serumverdünnung + 20%ige Trichloressigsäure zu gleichen Teilen.

Messung: Grünfilter L_2 und Scheibe 2.

	Gemessene Lösungen				Meßergebnisse			
Nr.	Ausgangslösung ccm	0,9%ige + NaCl-Lsg. ccm	+ Reagens ccm	=%	E-Ablesung			=%
1.	5	0	5	100	0,90	0,89	0,89	100
2.	4,5	0,5	5	90	0,83	0,83	0,82	86,9
3.	4,0	1,0	5	80	0,80	0,80	0,79	81,3
4.	3,5	1,5	5	70	0,77	0,77	0,76	75,7
5.	3,0	2,0	5	60	0,73	0,72	0,72	67,6
6.	2,5	2,5	5	50	0,66	0,66	0,67	58,8
	Nachträgliche Verdünnung:							
7.	2,5 von 1.	2,5	—	50	0,49	0,49	0,495	39,8
8.	2,5 „ 1.	—	2,5	50	0,48	0,49	0,48	38,9
9.	4 „ 2.	2	—	60	0,50	0,50	0,51	40,8
10.	4 „ 2.	—	2	60	0,72	0,73	0,73	68,9
11.	3 „ 3.	1	—	60	0,55	0,54	0,56	45,7
12.	3 „ 3.	—	1	60	0,68	0,67	0,68	61,7

Tabelle Nr. 22.

Bestimmung am Kaninchen.

Blut aus angeritzter Ohrvene mit Mikropipette abgenommen und mit 5 ccm 0.9%iger NaCl-Lösung + 0,5% Natr.Citrat gemischt und mit NaCl auf 200 bezw. 100fache Verdünnung gebracht.

Blutfarbstoffbestimmung über Haematin (3 ccm Blutverdünnung + 1,5 ccm $\frac{n}{3}$ HCl).

Eiweißbestimmung im Zentrifugat der Blutverdünnung mittels 20%iger Sulfosalicylsäure.

Zentrifugat wurde dazu 1. 5fach (1 ccm + 4 ccm NaCl)
2. 10fach (0,5 ccm + 4,5 ccm NaCl)

verdünnt und zu den erhaltenen 4 Proben zu je 5 ccm jeweils 5 ccm 20%ige Sulfosalicylsäure zugegeben.

Haematinbestimmung.

Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke: Vgl. Lsg.: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen		Meßergebnisse		
Nr.	Entnommene Blutmenge ccm	Blut-verdünnung in Meßlösung	E-Ablesung		
1.	0,04	1 : 300	0,265	0,25	0,26
2.	0,034	1 : 300	0,27	0,27	0,27
3.	0,069	1 : 150	0,53	0,53	0,53
4.	0,065	1 : 150	0,54	0,535	0,545

Eiweißbestimmung.
Grünfilter L_2 und Scheibe 4.

Nr.	Blut-verd.	Zentrifugat 5fach verdünnt E-Ablesung			Blut-verd.	Zentrifugat 10fach verdünnt E-Ablesung		
1.	1:1500	0,43	0,425	0,42	1:3000	0,22	0,22	0,22
2.	1:1500	0,44	0,44	0,445	1:3000	0,22	0,21	0,22
3.	1:750	0,81*)	0,82*)	0,82*)	1:1500	0,46	0,465	0,46
4.	1:750	0,83*)	0,83*)	0,83*)	1:1500	0,46	0,45	0,445

Tabelle Nr. 23.

Bestimmung am Kaninchen.

Blut aus angeritzter Ohrvene mit Mikropipette abgenommen und mit 2 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung + 0,5% Natr.Citrat gemischt und mit NaCl auf 40fache, bezw. 25fache, bezw. 30fache Verdünnung gebracht.

Blutfarbstoffbestimmung über Haematin (0,5 ccm Blutverdünnung + 3,5 ccm $\frac{n}{10}$ HCl).

Eiweißbestimmung im Zentrifugat der Blutverdünnung mittels der Biuretprobe.

Dabei Verdünnung des Zentrifugats:

1.) 1,6 ccm Zentrifugat + 2,3 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH + 0,1 ccm Fehling I (Endverd. 1 : 100)

2.) 1,4 ccm Zentrifugat + 2,0 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH + 0,1 ccm Fehling I (Endverd. 1 : 63,5)

3.) 1,4 ccm Zentrifugat + 2,0 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH + 0,1 ccm Fehling I (Endverd. 1 : 75)

Haematinbestimmung.

Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vgl. Lsg.: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen		Meßergebnisse			
Nr.	Entnommene Blutmenge ccm	Blutverdünnung in Meßlösung	E-Ablesung			E umgerechnet auf Verd. 1 : 100
1.	0,064	1 : 320	0,14	0,145	0,14	0,45
2.	0,091	1 : 200	0,20	0,21	0,215	0,42
3.	0,069	1 : 240	0,19	0,18	0,18	0,44

Eiweißbestimmung.

Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vgl. Lsg.: Aqu. dest.

Nr.	Blutverdünnung in Meßlösung	E-Ablesung			E umgerechnet auf Verd. 1 : 100
1.	1 : 100	0,17	0,18	0,175	0,175
2.	1 : 63,5	0,28	0,27	0,28	0,175
3.	1 : 75	0,24	0,24	0,25	0,182

Tabelle Nr. 24.

Bestimmung am Meerschweinchen.

Blut aus der Ohrmuschel des Meerschweinchens aus Scherenschlag mit Mikropipette abgenommen und mit 2 ccm 0.9%iger NaCl-Lösung + 0,5% Natr.Citrat gemischt und mit der genannten NaCl-Citrat-Lösung auf 50fache Verdünnung gebracht.

Blutfarbstoffbestimmung über Haematin

1.) 1 ccm Blutverdünnung + 3 ccm $\frac{n}{10}$ HCl

2.) 0,9 ccm Blutverdünnung + 2,7 ccm $\frac{n}{10}$ HCl.

Eiweißbestimmung im Zentrifugat der Blutverdünnung mittels der Biuretprobe.

Dabei Verdünnung des Zentrifugats:

1.) 2.0 ccm Zentrifugat + 1,9 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH + 0.1 ccm Fehling I (Endverd. 1 : 100).

2.) 1.2 ccm Zentrifugat + 2,3 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH + 0.1 ccm Fehling I (Endverd. 1 : 150)

Haematinbestimmung.

Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke: Vgl. Lsg.: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen		Meßergebnisse			
Nr.	Entnommene Blutmenge ccm	Blut-verdünnung in Meßlösung	E-Ablesung			E umgerechnet auf Verd. 1 : 100
1.	0,066	1 : 200	0,74	0,73	0,74	1,47
2.	0,048	1 : 200	0,74	0,745	0,735	1,48

Eiweißbestimmung.

Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke: Vgl. Lsg.: Aqu. dest.

Nr.	Verdünnung d. Zentrifugats	E-Ablesung		
1.	1 : 100	0,175	0,17	0,175
2.	1 : 150	0,115	0,11	0,115

Tabelle Nr. 25.

Bestimmung am Meerschweinchen.

Blut aus der Ohrmuschel des Meerschweinchens aus Scherenschlag mit Mikropipette abgenommen und mit 2 ccm 0,9%iger NaCl-Lösung + 0,5 % Natr. Citrat gemischt und mit der genannten NaCl-Citrat-Lösung auf 50fache Verdünnung gebracht.

Blutfarbstoffbestimmung über Haematin (1 ccm Blutverd. + 3 ccm $\frac{n}{10}$ HCl)

Eiweißbestimmung im Zentrifugat der Blutverdünnung mittels der Biuretprobe.

Dabei Verdünnung des Zentrifugats:

1.) 2,0 ccm Zentrifugat + 1,9 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH + 0,1 ccm Fehling I (Endverd. 1 : 100).

2.) 2,0 ccm Zentrifugat + 1,9 ccm $\frac{n}{1}$ NaOH + 0,1 ccm Fehling I (Endverd. 1 : 100).

Haematinbestimmung.

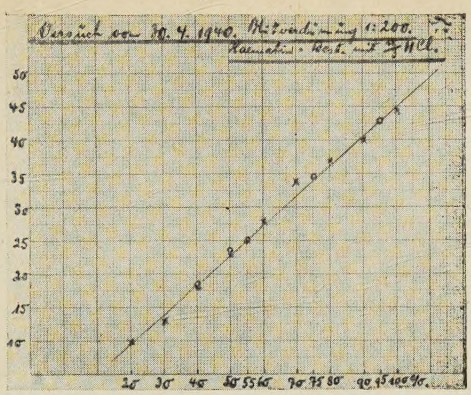
Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vgl. Lsg.: Aqu. dest.

	Gemessene Lösungen		Meßergebnisse			
Nr.	Entnommene Blutmenge ccm	Blutverdünnung in Meßlösung	E-Ablesung			E umgerechnet auf Verd. 1 : 100
1.	0,068	1 : 200	0,73	0,72	0,74	1,46
2.	0,064	1 : 200	0,72	0,72	0,73	1,44

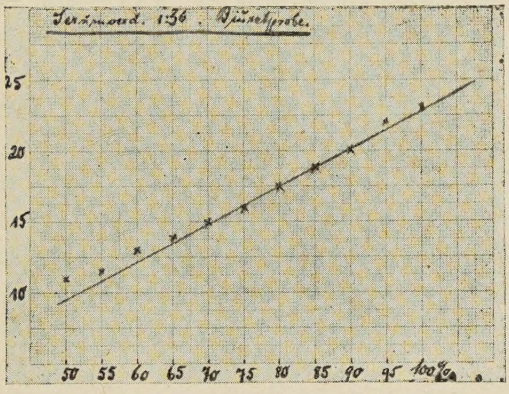
Eiweißbestimmung.

Filter S 53 (grüngelb); Cuvette 1 cm Schichtdicke; Vgl. Lsg.: Aqu. dest.

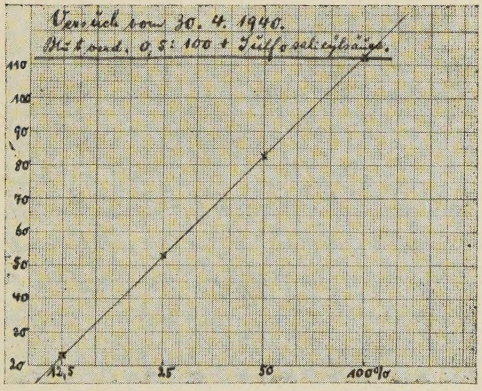
Nr.	Verdünnung d. Zentrifugats	E-Ablesung		
1.	1 : 100	0,16	0,165	0,165
2.	1 : 100	0,17	0,17	0,165



Kurve zu Tabelle Nr. 1.



Kurve zu Tabelle Nr. 13 B_2.



Kurve zu Tabelle Nr. 18.

Lebenslauf.

Ich wurde geboren am 24. Oktober 1882 in Ulm a. D. als Sohn des im Jahre 1899 verstorbenen Oberroßarztes im Württ. Remontedepot Breithülen Aloys Huber und seiner Ehefrau Pauline, geb. Müller. In Ulm besuchte ich die Elementarschule und das Realgymnasium bis Primareife. Die ordentliche Reifeprüfung bestand ich 1912 am Kgl. Realgymnasium Stuttgart. Im Jahre 1898 widmete ich mich dem Studium der Tierheilkunde an der Tierärztlichen Hochschule Stuttgart und bestand dortselbst im Jahre 1900 die naturwissenschaftliche Prüfung und 1902 die tierärztliche Approbationsprüfung. Meine Promotion zum Dr. med. vet. seitens der Veterinär-Medizinischen Fakultät der Universität Bern erfolgte 1909 auf Grund meiner Inaugural-Dissertation: „Die Ehrlich'sche Diazoreaktion. Eine Monographie mit Beiträgen über den Ausfall der Reaktion bei gesunden und kranken Tieren." Meiner Militärdienstpflicht genügte ich beim Ulanenregiment Nr. 20 und trat dann in die aktive Veterinäroffizierlaufbahn ein, in Verfolg derer ich Kommandos zur Med. Klinik der Tierärztlichen Hochschule Stuttgart und zur Militär-Veterinärakademie Berlin hatte. Dortselbst bestand ich im Jahre 1912 die Stabsveterinär-Prüfung.

Am 2. 8. 1914 rückte ich ins Feld und war bei mehreren Kavallerie-Regimentern $2^3/_4$ Jahre lang auf verschiedenen Kriegsschauplätzen ununterbrochen an der Front; hierauf war ich dann bis Kriegsschluß Leiter von Pferdelazaretten auf dem östlichen Kriegsschauplatz. Nach Kriegsende war ich als Bataillonsveterinär im RW.-Pionier-Batl. 13 und im Heimatspferdelazarettdienst, bis Ende 1920 mein Ausscheiden aus dem aktiven Heeresdienst wegen der im Versailler Vertrag verlangten Verminderung der Wehrmacht erfolgen mußte. Daraufhin war ich 12 Jahre Gestütstierarzt am Privatgestüt Weil. Nach der Auflösung dieses Gestüts widmete ich mich im SS. 1933 dem Studium der Medizin an der Universität Tübingen und bestand dortselbst im Februar 1935 die ärztliche Vorprüfung und im Juli 1939 das medizinische Staatsexamen.